Aus der Medizinischen Klinik der Universität Breslau
(Direktor: Prof. Dr. Gutzeit).

Untersuchungen an Fluorescyten

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizinischen Fakultät

an der Schlesischen Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Breslau

vorgelegt von

CORNELIA ZABRZESKI

1939

Buchdruckerei Paul Plischke, Breslau 1

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Breslau

---

1. Referent: Dr. Dr. Ammon
2. Referent: Prof. Dr. Gutzeit
Dekan: Prof. Dr. Gutzeit

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Gliederung:

Methodik der Fluoreszenzmikroskopie.

Untersuchungen an Fluorescyten im normalen menschlichen und tierischen Blut.

Versuche zur Frage der Identität von Retikulocyten und Fluorescyten.

Beeinflussung der Fluorescyten durch Knochenmarksextrakt von B a u m a n n und durch Photodyn.

Literaturübersicht.

Die Haematologie ist in den letzten Jahren um eine neue Zellart bereichert worden. Keller und Seggel (10) bezeichneten diese neuen Zellen als Fluorescyten und verstanden darunter rotfluoreszierende, der Reihe der roten Blutkörperchen angehörige Zellen.

1929 beschrieben Borst und Königsdörffer (3) erstmalig Zellen, die eine rote Fluoreszenz zeigten. Es handelte sich damals um einen Porphyriefall, dessen Milz zur Untersuchung gelangte. In der roten Pulpa dieser Milz sahen sie im Fluoreszenzmikroskop teils vereinzelte, teils in kleinen Häufchen liegende und schmutzig oder rein rosarot aufleuchtende Zellen. Von dieser Beobachtung ausgehend, haben Borst und Königsdörffer an normalen Menschen und Tieren fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der verschiedenen Blutbildungsstätten vorgenommen, um zu sehen, ob es sich um eine normale oder pathologische Zellform handele. Das Resultat war verschieden und zeigte eine Abhängigkeit vom Entwicklungsalter des untersuchten Objektes. In den Blutbildungsstätten jugendlicher Organismen waren diese Zellen außerordentlich häufig anzutreffen, während bei erwachsenen Tieren und Menschen diese Zellen nur recht spärlich gefunden wurden. Borst und Königsdörffer gingen nun weiter und stellten die gleichen Untersuchungen an pathologischen Fällen an, und zwar bevorzugten sie die Anämien. Auch hier konnten in den Blutbildungsstätten die rotfluoreszierenden Zellen nachgewiesen werden.

Durch diese Befunde angeregt, nahmen Hijmanns, v. d. Bergh, Grotepass und Rewers (8) fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen vor, die sie zunächst wahllos an dem ihnen zur Verfügung stehenden Krankenblut durchführten. Es handelte sich um Carcinome im kachektischen Stadium, um Lungentuberkulosen mit hohem Fieber und um einen Ikterus. Bei allen drei Erkrankungen konnten sie im strömenden Blut (und zwar im Blutausstrich) mit Sicherheit rotfluoreszierende Zellen sehen.

Den bisherigen Ergebnissen stellten sich Emminger und Battistini entgegen (4), die im strömenden Blut keine einwandfrei fluoreszierende Zelle fanden, wie es die vorher genannten Autoren gesehen zu haben glaubten.

Dieser Meinung schloß sich Hamperl (6) an, der in seiner zusammenfassenden Arbeit über die Fluoreszenzmikroskopie menschlicher Gewebe zu folgendem Resultat kam: „Die roten Blutkörperchen fluoreszieren weder im frischen noch im fixierten Zustand".

Als im Jahre 1936 Keller und Seggel aus der Leipziger Medizinischen Universitätsklinik eine neue Untersuchungsmethode für die Fluoreszenzmikroskopie der Erythrocyten angaben, schien die Existenz der rotfluoreszierenden Erytrocyten in den Blutbildungsstätten für einen großen Teil der Autoren gesichert. Nur ein kleiner Teil lehnte das Vorkommen dieser Zellen ab.

Die bisherigen Befunde erfuhren durch die Untersuchung von Keller und Seggel eine erhebliche Erweiterung. Während früher die Untersuchung im Trocken-Ausstrich oder Gewebsschnitt vorgenommen wurde, arbeiteten Keller und Seggel an frischen Erythrocytenaufschwemmungen. Ihre Untersuchungen erstreckten sich zunächst auf Menschen und Tiere mit normalem roten Blutstatus. Als Untersuchungstiere wurden Kaninchen, Meerschweinchen, Ratten und weiße Mäuse herangezogen. Das Ergebnis war folgendes: Bei Menschen sowie bei den untersuchten Tieren sind Fluorescyten nachweisbar und zwar beim gesunden Menschen in einer Zahl von unter 1 ‰ (pro mille).

Nachdem der Nachweis der Fluorescyten somit endgültig gesichert war, auch die Normalzahlen feststanden, ging Seggel (14) daran, auch Abweichungen von der Norm bei den verschiedenen Krankheitsfällen zu suchen, wobei ihn an erster Stelle die Anämien interessierten. Er fand, daß sich bezüglich der Fluorescytenzahl bei den sekundären Anämien graduelle Unterschiede fanden, die deutliche Abhängigkeit von der Fähigkeit des Körpers, zu regenerieren, zeigten. Bei prognostisch günstigen Fällen beobachtete er eine deutliche Fluorescytenvermehrung, während bei desolaten Fällen die Fluorescyten ganz fehlten oder die Fluorescytenzahl ganz niedrig war. Nach diesen Untersuchungen kam Seggel zu der Überzeugung, daß es sich bei den Fluorescyten wahrscheinlich um eine

Zellform, die einen Regenerationstyp darstellt, handeln müsse. Den naheliegenden Gedanken, daß es möglicherweise Retikulocyten seien, die diese physikalisch-chemische Eigenschaft zeigen, lehnt er ab.

Die Untersuchungen, die an der Leipziger Klinik weiter fortgeführt wurden, führten 1939 zu einer Veröffentlichung von Müller-Neef (13). In dieser Arbeit berichtet Müller-Neef über die Resistenz der Fluorescyten gegenüber Saponinen, hyper- und hypotonischen Lösungen. Er kommt zu der Überzeugung, daß es sich bei den Fluorescyten um jugendliche Zellen handeln müsse. Es zeigte sich nämlich, daß die Fluorescyten eine erhöhte Resistenz aufwiesen gegen hypotonische NaCl-Lösung und Saponine, wie sie jugendlichen Zellen eigen ist.

Überblickt man in der Literatur die bisherigen Ergebnisse über den Nachweis und das Vorkommen der Fluorescyten, so stellt es sich heraus, daß die Fluorescyten eine Zellart sind, die offenbar mit der Blutbildung im Zusammenhang stehen, und daß sie überall dort eine Rolle zu spielen scheinen, wo die Erythropoese gestört ist. Normalerweise lassen sich Fluorescyten im menschlichen Blut in einer Höhe von unter 1 ‰ nachweisen. Bei den Tieren ist die Zahl der Fluorescyten unterschiedlich.

Nachdem, wie aus dem Vorangegangenen zu ersehen ist, die Existenz der Fluorescyten gesichert erschien, suchte man nach einer Erklärung für die Fluoreszenz der Erythrocyten. Es lag nahe, gewisse Porphyrine dafür verantwortlich zu machen, da von ihnen diese Erscheinung bekannt ist und die chemischen Beziehungen zwischen Porphyrin und Haemoglobin als gesichert gelten können. (H. Fischer (5)). Es bestehen allerdings noch Meinungsverschiedenheiten darüber, ob diese den Porphyrinen nahestehende Substanz in der reifenden oder der alternden Zelle eine Rolle spielt, ob es demnach ein Aufbau- oder Abbauprodukt darstellt. Mit einiger Sicherheit scheint festzustehen, daß die in den Erythrocyten rotfluoreszierende Substanz ein zum Hämin gehöriges Protoporphyrin ist.

Das Ziel meiner Arbeit ist es nun:

1. Den Nachwis über das schon Bekannte der Fluorescyten zu führen,

a) Vorkommen der Fluorescyten im menschlichen und tierischen Blut,

b) Zahl der Fluorescyten beim gesunden Menschen und bei einzelnen Tieren.

c) Leuchtdauer der Fluorescyten,

d) Vorkommen der Fluorescyten bei den verschiedenen Anämieformen zu führen,

2. möglicherweise bestehende Beziehungen zwischen Fluorescyten und Reticulocyten zu suchen.

Bei meinen Untersuchungen habe ich mich genau an die von K e l l e r und S e g g e l angegebene Methode gehalten, die ich zunächst kurz anführen möchte.

Die dazu notwendige Apparatur ist das von der Firma Z e i ß hergestellte Luminescenzmikroskop, das sich von anderen Mikroskopen durch die Art der Lichtquelle und die besondere Filterung des Lichtes unterscheidet.

Als Lichtquelle dient eine Kohlenbogenlampe von 6 Amp. Stromstärke, die durch ein Uhrwerk reguliert wird. Der Beleuchtungsapparat besteht aus dem Kollektor, den Beleuchtungsfiltern und dem Mikroskopkondensor. Um das Ultraviolett-Licht ohne Schwächung hindurchzulassen u. die durch gewöhnliches Glas bedingte Fluorescenzstrahlung zu vermeiden, sind der Kollektor und das Prisma aus Quarz hergestellt. Als Filter dient erstens eine Cüvette, deren Wände aus Ultraviolett durchlässigem Glas bestehen, und die mit einer 4%igen Kupfersulfatlösung gefüllt ist, der zur Klärung einige Tropfen konzentrierte Schwefelsäure zugesetzt sind. Zweitens ein Uvet-Glasfilter von 1,5 mm und ein zweites von 3,5 mm Dicke. Auf die Cüvette folgt eine Irisblende, die zur Beseitigung störenden Luminiszenzlichtes dient, das bei zu großem bestrahlten Feld in der Umgebung der betrachteten Objektstelle entsteht. Da das im Präparat entstehende Luminiszenzlicht sichtbar ist, konnten gewöhnliche Glasobjektive und Glasokulare verwandt werden. Um eine eventuelle, durch Flußspat bedingte Fluoreszenz zu vermeiden, kann als Deckglas ein Euphosdeckglas verwandt werden, das das Ultraviolett-Licht absorbiert. Gegen den Rest des Ultraviolett-Lichtes wird das Auge durch ein Okularfilter, das aus Euphos- oder einem ähnlichen Glas besteht, geschützt.

Die Erythrocytenuntersuchung mit dem Fluoreszenzmikroskop gestaltet sich nun folgendermaßen: In eine Erythrocyten-Zählpipette wird bis zur Marke 0,5 Blut aufgesogen und mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Als Verdünnungsmittel eignen sich auch andere Lösungen,

die sonst zur Verdünnung der Erythrocyten benutzt werden. Nur erscheint die Hayem'sche Lösung wahrscheinlich infolge ihres Sublimatgehaltes für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen ungeeignet. Die erhaltene Erythrocyten-Aufschwemmung wird in eine von der Firma Zeiß für die Untersuchungen besonders hergestellte Beobachtungskammer gebracht, deren Objektträger aus Bergkristall und deren Deckglas aus Euphosglas besteht.

Nachdem die Kammer beschickt ist, wartet man kurze Zeit, etwa eine Minute bis zur vollständigen Sedimentierung der Erythrocyten in der Kammer, ehe man diese in den Strahlengang des Mikroskopes bringt. Das Abwarten der Sedimentierung ist wichtig, da der noch in Bewegung befindliche Erythrocyt Gefahr läuft, vorzeitig vom Ultraviolett-Licht getroffen zu werden, bevor er ins Blickfeld gelangt und dadurch der Zählung verloren geht. Diese Forderung hat insofern ihre Berechtigung, als die Erscheinung der Fluoreszenz nur von sehr kurzer Dauer ist und nach einmaliger Anstrahlung erlischt. Außerdem ist es für diese Untersuchungen wichtig, daß die Pipette bald nach der Blutentnahme verarbeitet wird, da es sich erwiesen hat, daß die Zahl der Fluorescyten auch bei längerem Stehen eine Abnahme erfährt. (Keller und Seggel l. c.). Auch die dem Einfluß des Tageslichtes entzogenen Pipetten zeigten das gleiche Verhalten. Eine weitere Abnahme der Fluorescyten kann dadurch bedingt sein, daß selbst in isotonischer Lösung mit der Zeit eine Zelldeformation eintritt, die mit dem Verlust der Fluoreszenz einhergeht. Eine ebenfalls zu beachtende Fehlerquelle für diese Versuche ist die einsetzende Autolyse. In diesem Prozeß findet eine Bildung von Fäulnis-Porphyrin statt, das mit dem Protoporphyrin identisch ist und damit eine Zunahme der Fluorescyten vortäuscht.

Nach Berücksichtigung dieser möglichen Fehlerquellen kommt man nun zu der Auszählung der Fluorescyten, für deren Berechnung im Okular ein Zählnetzfeld eingelegt wird. Keller und Seggel sind folgendermaßen vorgegangen: Im Ultraviolett-Licht wird zunächst in einer Reihe von Gesichtsfeldern die Anzahl der fluoreszierenden Erythrocyten pro Zählnetzfeld bestimmt, dann wird bei weißem Licht in einer Reihe von Gesichtsfeldern die Gesamtzahl der Eryhtrocyten pro Zählnetzfeld ausgezählt. Durch Vergleich der beiden ermittelten Durchschnittswerte ergibt sich die %-Zahl der fluoreszierenden Erythrocyten.

Vorbedingung für die Auszählung der Fluorescyten sind ein gut abgedunkeltes Zimmer, gute Adaption des untersuchenden Auges. Außerdem ist darauf zu achten, daß die ausgezählten Gesichtsfelder weit voneinander entfernt liegen, damit man die Gewißheit hat, ein noch nicht vom Ultraviolett-Licht getroffenes Feld im Blickfeld zu haben.

Eigene Untersuchungen:

Meine nach der oben angegebenen Methode vorgenommenen Untersuchungen erstrecken sich zunächst auf den Nachweis der Fluorescyten im normalen menschlichen und tierischen Blut. Folgende Beobachtungen stützen sich auf die Blutuntersuchung an 20 normalen Menschen, 26 erwachsenen Kaninchen, 20 Meerschweinchen und 10 weißen Ratten.

Die im Blickfeld auftretenden fluoreszierenden Zellen von der Größenordnung der Erythrocyten zeigten

1. eine verschiedene Dauer der Fluoreszenz,
2. einen verschiedenen Stärkegrad der Strahlung,
3. gewisse Farbnuancen, die zwischen hell- und dunkelrot und mit einem Stich ins Bräunliche schwankten. Das Gesichtsfeld, in dem keine Fluorescyten auftauchten, erschien dunkelgrau-violett.

Ich bestimmte zunächst die Leuchtdauer der Fluorescyten. Es zeigte sich, daß die Leuchtdauer zwischen einem eben wahrnehmbaren Aufleuchten und einer Leuchtdauer bis zu 45 Sekunden variierte. Die von K e l l e r und S e g g e l angegebene Leuchtdauer dagegen betrug selbst bei den hellsten Zellen höchstens 30 Sekunden.

Nun wurde die Zahl der Fluorescyten bestimmt. Auch hierbei habe ich mich an die Methode von K e l l e r und S e g g e l gehalten. Beim Meerschweinchen bewegt sich die Fluorescytenzahl zwischen 60 und 10 ‰, wobei sicher das Alter des Tieres eine Rolle spielt. Bei den erwachsenen Kaninchen (26 Versuchstiere) und bei den weißen Ratten (10 Versuchstiere) war in keinem Falle auch nur eine einzige fluoreszierende Zelle zu sehen, während K e l l e r und S e g g e l für diese Tiere einen Fluorescytengehalt von unter 1 ‰ angaben. Die Fluorescytenzahlen beim gesunden Menschen lagen übereinstimmend mit den von K e l l e r und S e g g e l angegebenen Werten unter 1 ‰.

Wichtig erscheint mir noch die Feststellung der Schwankungsbreite der Fluorescyten unter physiologischen Verhältnissen, was das Ergebnis der folgenden Untersuchungen sein soll.

Es wurden hierzu 4 Meerschweinchen, die unter den gleichen Bedingungen gehalten wurden, an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen kontrolliert. Die Zeit der Blutentnahme lag immer um die gleiche Stunde.

Fluorescytenzahl bei 4 Meerschweinchen.

Beobachtungstage:	I.	II.	III.	IV.
1.	20‰	30‰	26‰	30‰
2.	24‰	34‰	34‰	28‰
3.	22‰	26‰	28‰	20‰
4.	14‰	36‰	14‰	20‰
5.	24‰	28‰	18‰	18‰
6.	20‰	18‰	22‰	28‰
7.	18‰	24‰	28‰	24‰
8.	12‰			18‰
9.	14‰			26‰
10.	18‰			

Überblickt man die in der vorhergehenden Tabelle angeführten Zahlen unter Berücksichtigung der Fehlergrenze, die etwa bei 10% liegen dürfte, so kommt man zu dem Ergebnis, daß auch unter gleichbleibenden Bedingungen die Zahl der Fluorescyten nicht konstant ist, vielmehr eine recht erhebliche Schwankungsbreite zeigt, die oft mehr als 50% beträgt.

Zusammengefaßt stimmen meine Ergebnisse bis auf die Differenz im Tierblut (Kaninchen, weiße Ratte) und eine geringe Differenz in der Leuchtdauer mit denen der Literatur überein.

Fluorescytenzahl:

Mensch	unter 1 ‰
Meerschweinchen	10—60‰
Ratte	∅
Kaninchen	∅

Als bisher nicht beschrieben, beobachtete ich recht erhebliche physiologische Schwankungsbreiten der Fluorescyten beim Meerschweinchen.

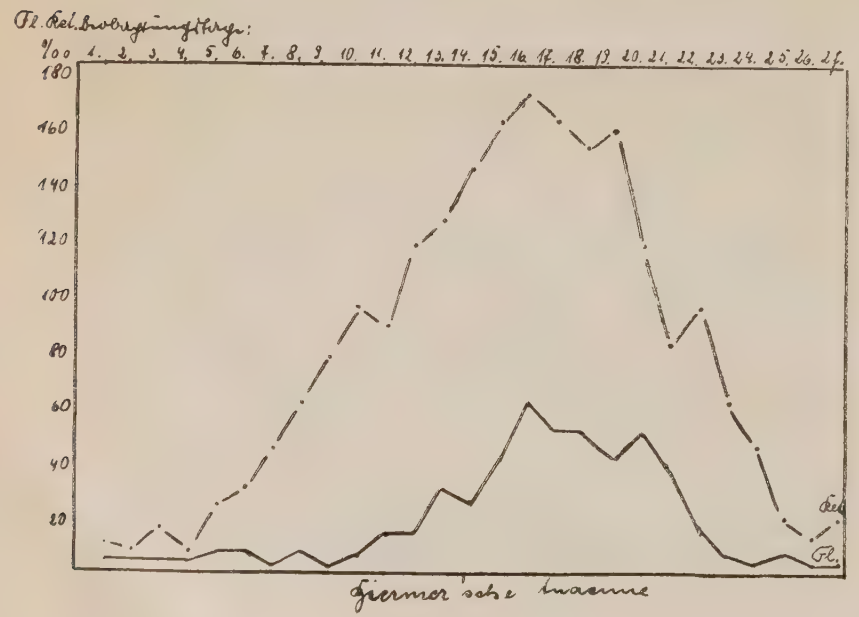
Fluorescytenbestimmung an pathologischen Fällen:

Aus der Literatur ist weiterhin ersichtlich, daß eine gute Blutregeneration bei den verschiedenen Anämieformen von einer Vermehrung der Fluorescyten begleitet ist. Der naheliegende Gedanke, daß es sich etwa um Reticulocyten handeln könnte, die die Träger der Fluoreszenz sind, wurde von S e g g e l kurz gestreift und abgelehnt. Es soll darum meine weitere Aufgabe sein, die Fragestellung nach der evtl. Identität beider Formen von Erythrocyten zu klären.

Verwertet wurden für diese Untersuchungen etwa 10 Anämiefälle. Darunter waren 5 Fälle von Biermer'scher Anämie und 5 sekundäre Anämien leichteren und schwereren Grades.

a) Biermer'sche Anämie.

Beim 1. Fall handelt es sich um eine Kranke, die, als ich sie das 1. Mal sah, einen Hgb.-Wert von 24% aufwies. Die Erythrocyten waren auf 800 000 gesunken, der Färbeindex betrug 1,5 und die Retikulocyten 6‰. Im Blutausstrich sah man das für eine Biermer'sche Anämie typische Bild. Die Behandlung erfolgte mit Leberpräparaten.



Wie aus obiger Kurve ersichtlich ist, erfolgte die Fluorescytenkrise gleichzeitig mit dem Einsetzen der Reticulocytenkrise, wie auch der Abfall und das Schwinden der Fluorescyten zeitlich mit dem der Reticulocyten zusammenfiel. Zahlenmäßig jedoch lagen die Fluorescyten- und Reticulocytenwerte nie zusammen, waren sogar weit voneinander entfernt.

Beim 2. Fall, den ich auch über längere Zeit kontrollieren und beobachten konnte, zeigte die Fluorescyten- und Reticulocytenkurve den gleichen Verlauf wie bei Fall 1.

Von den weiteren Perniciosafällen, die ich untersuchte, standen 2 am Ende der Behandlung. Bei dem einen betrug die Reticulocytenzahl 4 ‰, Fluorescyten waren nicht vorhanden und bei dem anderen waren die Retikulocyten auf 8 ‰ und die Fluorescyten auf 2 ‰ gesunken.

Der 5. Fall stand mitten in der Behandlung. Das Hämoglobin war auf 60%, die Erythrocyten auf 3 Millionen angestiegen. Die Retikulocytenzahl betrug 80 ‰, die Fluorescyten 40 ‰. Beachtet man bei den 3 letzten Fällen das Stadium, in dem sich die Anämien befinden, so zeigt es sich, daß die Fluorescyten- und Retikulocytenwerte mit denen der vorher angeführten Kurve übereinstimmen.

b) Sekundäre Anämien:

Bei den sekundären Anämien ist das Verhältnis Fluorescyten zu Retikulocyten ein anderes als bei der Biermer'schen Anämie. Es seien hier kurz 3 Fälle von gut regenerierender sekundärer Anämie angeführt. Bei Fall 1 handelte es sich um ein ulcus ventriculi mit Haematemesis und Melaena. Bei Fall 2 um Metrorrhagien, bei Fall 3 um Myomblutungen.

Fall 1: Ulcus ventriculi.

Beobachtungstag:	Fluorescyten	Reticulocyten	Hgb.
1.	4‰	0‰	45%
2.	10‰	6‰	57%
3.	18‰	12‰	64%
4.	14‰	20‰	70%
5.	8‰	24‰	75%
6.	6‰	40‰	78%

Dieser Fall zeigt einen gleichzeitigen Anstieg der Fluorescyten- und Retikulocytenwerte und einen Abfall der Fluorescyten bei weiterem Anstieg der Retikulocyten zu einer Zeit, als der Hgb.-Spiegel sich der Norm näherte.

Fall 2: Metrorrhagien.

Beobachtungstag:	Fluorescyten	Reticulocyten	Hgb.
1.	34‰	10‰	20%
2.	34‰	14‰	30%
3.	38‰	20‰	30%
4.	44‰	36‰	35%
5.	80‰	42‰	45%
6.	60‰	46‰	50%

Dieser Fall, der nicht bis zum Normalwerden des Hgb.-Spiegels beobachtet werden konnte, läßt in seiner Kürze doch annähernd den gleichen Verlauf wie der oben angeführte erkennen.

Fall 3 ist in seinem Retikulocyten- und Fluorescytenverlauf den beiden anderen Fällen gleich.

Vergleicht man das Verhalten der Fluorescyten und Retikulocyten bei der Biermer'schen und der sekundären Anämie, so zeigt es sich, daß bei ersterer Retikulocyten und Fluorescyten einen gleichen Kurvenverlauf nehmen, wobei die Retikulocytenwerte höher liegen als die der Fluorescyten, während bei der sekundären Anämie die beiden Kurven zeitweise auseinander streben und die Fluorescytenwerte höher liegen als die Retikulocytenwerte.

Außer den 3 Fällen von gut regenerierender sekundärer Anämie kamen noch 2 sekundäre Anämien zur Beobachtung, die durch Carcinom verursacht waren. Ihr Fluorescyten- und Retikulocytenverlauf zeigt keinerlei Gesetzmäßigkeit. Das Verhalten der Fluorescyten gegenüber den Retikulocyten ist vollkommen uneinheitlich.

Fall 1: Collum—Carcinom.

Beobachtungstag:	Hgb.	Fluorescyten	Beticulocyten
1.	20%	14‰	62‰
2.	30%	12‰	38‰
3.	40%	10‰	48‰
4.	45%	10‰	10‰
5.	50%	10‰	14‰

Fall 2: Collum—Carcinom.

Beobachtungstag:	Hgb.	Fluorescyten	Beticulocyten
1.	33%	∅‰	12‰
2.	40%	∅‰	28‰
3.	40%	10‰	16‰
4.	35%	20‰	16‰
5.	Exitus letalis.		

Da die bisherigen Befunde noch zu keinem endgültigen Schluß berechtigen, bin ich zur weiteren Klärung der Identitätsfrage von Retikulocyten und Fluorescyten tierexperimentell vorgegangen. Für die folgenden Versuche benutzte ich die Ergebnisse:

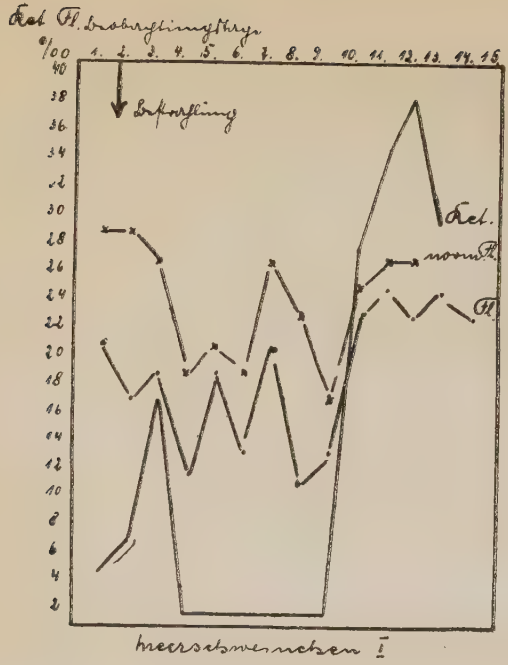
1. Der Radiologie,
2. Der Vitaminforschung.

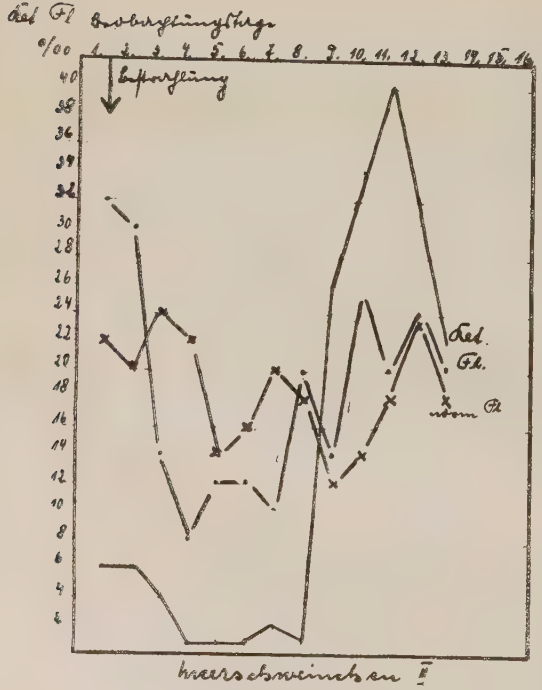
In Anlehnung an die Untersuchungen Langendorff's (12) habe ich zunächst versucht, mit Röntgenstrahlen eine Fluorescytose zu erzeugen.

Langendorff zeigte vor einiger Zeit, daß nach Bestrahlung der weißen Maus mit verschiedenen hohen Röntgendosen (100, 200 u. 400 r) regelmäßig nach der Bestrahlung ein Abfall der Retikulocytenwerte einsetzte. Am 3. Tage nach der Bestrahlung erreichten diese ihren Tiefstwert, der je nach der verabreichten Dosis höher oder tiefer lag. Auf dieses Minimum folgte ein steiler Anstieg der Retikulocyten, der am 5. bis 7. Tage seinen Höhepunkt erreichte. Es schloß sich dann ein wellenförmiger Verlauf der Retikulocytenwerte an, die allmählich wieder zu ihren Ausgangswerten zurückkehrten.

Die Veranlassung zur Anstellung folgneder Versuche war die Erwägung, daß bei einer Identität von Retikulocyten und Fluorescyten durch Röntgenstrahlen oder Vitamingaben nicht nur eine Retikulocytose sondern auch eine Fluorescytose erzeugt werden müsse.

Als erstes Bestrahlungstier wählte ich das Meerschweinchen. Nachdem 3 Meerschweinchen unter völlig gleichen Bedingungen gehalten, und bei jedem Tier einige Tage vor der Bestrahlung die Retikulocyten- und Fluorescytenzahl kontrolliert worden war, wurde mit der Bestrahlung begonnen. Diese erfolgte in 30 cm Abstand von der Röhre bei 180 k V. und 4 m. Amp. (Cu-Filter 0,8 mm, Bestrahlungsdauer 11,8 Min.) Die Strahlendosis von 400 r wurde von den Meerschweinchen zunächst gut vertragen. Alle Tiere starben im Laufe der 3. Woche nach der Bestrahlung.


Kel. Fl. Beobachtungstage
%oo
1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15.
40
38
36
34
32
30
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
Beforgung
Kel.
norm. Fl.
Fl.
Meerschweinchen I


Kel. Fl. Beobachtungstage
%oo
1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16.
40
38
36
34
32
30
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
Beforgung
Kel.
Fl.
norm. Fl.
Meerschweinchen II

Überblickt man den Bestrahlungseffekt bei den Meerschweinchen, der aus obigen Kurven ersichtlich ist, so sieht man das Retikulocyten-Minimum auch am 3. Tage nach der Bestrahlung, während das Retikulocyten-Maximum auf den 10. bis 11. Tag fällt und nicht wie bei der Maus auf den 5. bis 7. Die dazugehörige Fluorescytenkurve zeigt ihr Minimum und Maximum an den gleichen Tagen wie die Retikulocyten. Vollkommen anders aber ist der Kurvenverlauf zwischen Minimum und Maximum Während die Retikulocytenwerte zwischen dem 3. und 10. Tage annähernd gleich bleiben, zeigen die Fluorescytenwerte erhebliche Schwankungen. Vergleicht man nun die normale Fluorescytenkurve mit der Bestrahlungskurve der Fluorescyten, so zeigt es sich, daß die Schwankungen fast parallel laufen und Fluorescytenwerte, die an eine Fluorescytose denken lassen, nie erreicht werden.

Weitere Bestrahlungsversuche wurden an der weißen Ratte vorgenommen, die auch mit 400 r unter den gleichen Bedingungen wie die Meerschweinchen bestrahlt wurden. Von den 5 bestrahlten Ratten kam es am 10. Beobachtungstage zum Ausfall zweier Tiere, die 3 anderen starben in den folgenden Tagen. Es lag nahe, bei der Ratte, die normalerweise keine Fluorescyten zeigte, nach der Bestrahlung analog dem Anstieg der Retikulocyten auch ein Auftreten von Fluorescyten zu erwarten.

Die Tiere wurden 14 Tage lang nach der Bestrahlung kontrolliert. Während die Retikulocytenwerte wie beim Meerschweinchen nach der Bestrahlung ein Minimum und Maximum erreichten, trat dagegen bei den bestrahlten Ratten in keinem Falle eine Fluorescytose auf.

Demnach ist es mir nicht gelungen, mit Röntgenstrahlen beim Meerschweinchen und bei der Ratte eine Fluorescytose zu erzeugen.

Außer den Röntgenstrahlen waren in der Literatur auch die Vitamine als Mittel beschrieben worden, die eine Retikulocytose im Gefolge haben sollten. Nachdem Seyderhelm und Grebe (15) 1935 die Vitamine, und zwar die Vitamine C, B und D als Retikulocytose erzeugende Mittel beschrieben, wurden diese Annahmen 1938 von Barbier (1), einem Schüler von A. v. Domarus für das Vitamin C und B widerlegt, der keinen sicheren Zusammenhang zwischen den gesetzten Reizen und dem Anstieg der Retikulocyten feststellen konnte. Trotzdem habe ich Versuche

mit Vitaminen angestellt, um einen evtl. möglichen Einfluß auf Retikulocyten und Fluorescyten zu sehen.

Die 1. Versuchsreihe wurde mit Vitamin B_1 angesetzt und zwar erhielten 3 Meerschweinchen Betabion i. m. und 2 Kaninchen Betabion i. v. Das Ergebnis zeigen folgende Tabellen.

Kaninchen I.

Tag:	Injektion:	Blutentnahme:	Retikulocyten	Fluorescyten
1.	—	12^{00}	38‰	∅
2.	—	16^{00}	49‰	∅
2.	2 ccm Betabion i. v. 17^{30}	18^{30}	37‰	∅
2.	—	19^{00}	46‰	∅
3.	—	16^{35}	46‰	∅
4.	—	16^{00}	26‰	∅
5.	—	16^{30}	35‰	∅

Meerschweinchen II.

Tag:	Injektion:	Blutentnahme:	Retikulocyten	Fluorescyten
1.	—	16^{30}	30‰	38‰
2.	—	16^{30}	20‰	80‰
2.	1 ccm Betabion i. m. 16^{35}	17^{05}	62‰	70‰
2.	—	17^{35}	58‰	40‰
2.	—	18^{05}	46‰	40‰
3.	—	16^{30}	12‰	42‰
3.	1 ccm Betabion i. m. 16^{35}	17^{05}	24‰	66‰
4.	—	16^{00}	35‰	32‰
5.	—	12^{00}	40‰	45‰
6.	—	17^{00}	28‰	36‰

Meerschweinchen I.

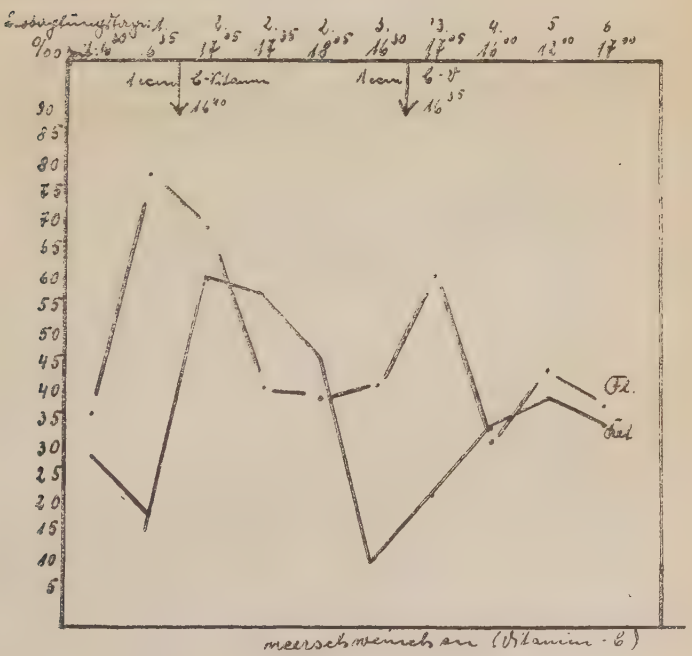
Tag:	Injektion:	Blutentnahme:	Retikulocyten	Fluorescyten
1.	—	16^{30}	20‰	74‰
2.	—	16^{30}	28‰	82‰
2.	2 ccm Betabion i. m. 16^{35}	17^{05}	38‰	94‰
2.	—	18^{05}	42‰	104‰
3.	—	17^{00}	22‰	70‰
4.	—	16^{30}	32‰	62‰
5.	—	12^{00}	40‰	68‰
6.	—	17^{00}	34‰	34‰

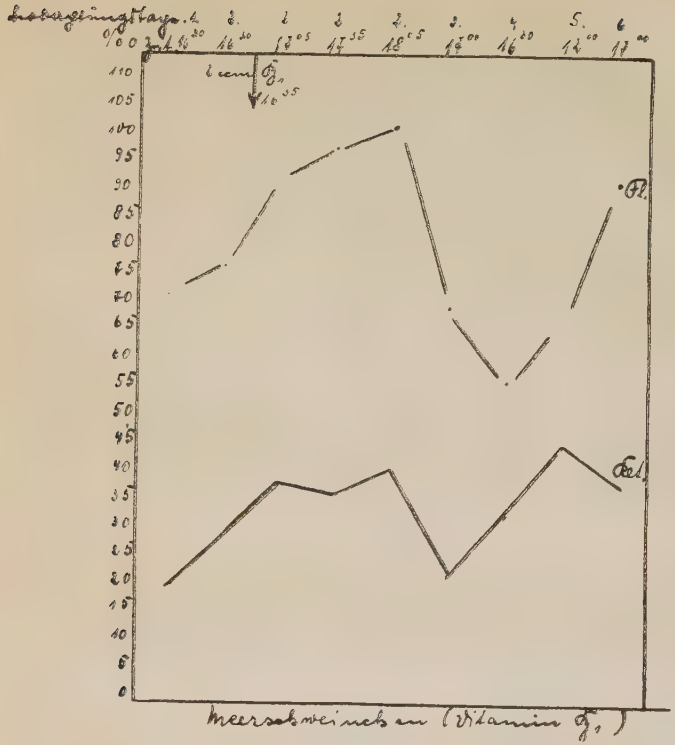
Bevor die Tabellen besprochen werden, seien hier gleich die anderen Vitaminversuche angeführt. Es wurden in einer zweiten Versuchsreihe 3 Meerschweinchen und 2 Kaninchen mit Vitamin D_3 behandelt und zwar erhielten alle Tiere D_3 in Form einer Injektion. Die Dosis betrug bei den Kaninchen 2 ccm, bei den Meerschweinchen ½ oder 1 ccm.

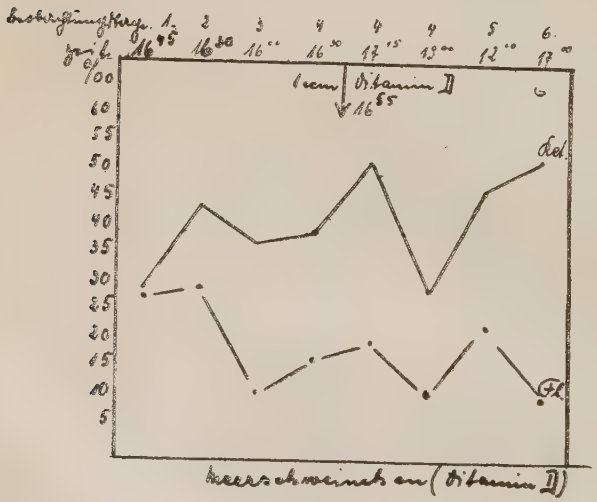
In der dritten Versuchsreihe spritzte ich 3 Meerschweinchen mit je 1 ccm Cebion Merck i. m. und 2 Kaninchen mit 2 ccm.

Da der Erfolg mit allen Vitaminen unabhängig von Injektionsmenge und -Art der gleiche war, glaube ich auf die Wiedergabe der übrigen Tabellen verzichten zu können.

Der leichteren Beurteilung der Fluorescyten und Retikulocytenwerte wegen möchte ich die Werte von je einem mit Vitamin C, B_1 und D_3 behandelten Tiere kurvenmäßig wiedergegeben.




Beobachtungstage
1.
2.
3.
4.
5.
6.
1 ccm Vit. II
16 55
Fl.
Del.
Meerschweinchen (Vitamin B1)


Beobachtungstage
1.
2.
3.
4.
4.
4.
5.
6.
1 ccm Vitamin II
16 55
Del.
Fl.
Meerschweinchen (Vitamin II)

Bei allen 3 Kurven kann ein annähernd paralleler Verlauf von Fluorescyten und Retikulocyten beobachtet werden, wobei die Fluorescytenwerte bei 2 Tieren über den Retikulocytenwerten und bei einem Tier unter diesen liegen. Aus derselben Kurve geht aber hervor, daß sowohl der Retikulocyten — als auch der Fluorescytenanstieg nicht nur auf die Injektion hin, sondern auch ohne jegliche Reizsetzung erfolgen kann. Danach wären die Vitamine als retikulocytosewirkendes Mittel abzulehnen.

Überblickt man nochmals kurz die Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen, so lassen sich folgende Gesetzmäßigkeiten herausstellen:

1. für die Biermer'sche Anämie:

Das Auftreten der Flurorescyten, ihr Anstieg und ihr Schwinden fallen hier zeitlich mit dem der Retikulocyten zusammen, wobei die Retikulocytenwerte stets höher liegen als die Fluorescytenwerte.

2. Für die sekundäre Anämie:

a) Prognostisch günstig zu beurteilende Fälle:

Hierbei gehen Retikulocyten- und Fluorescytenwerte nur anfangs parallel, wobei auch hier anfänglich die Retikulocytenwerte die Fluorescytenwerte übersteigen. Im Laufe der Behandlung sinken dann, und zwar zu einer Zeit da sich das Blutbild der Norm nähert, die Retikulocytenwerte unter die der Fluorescyten. Ihre Kurven laufen nicht mehr parallel sondern streben auseinander.

b) Prognostisch ungünstig zu beurteilende Fälle:

Bei diesen Anämien ist der Verlauf der Retikulocyten- und Fluorescytenkurve so uneinheitlich, daß sich hierbei keinerlei Gesetzmäßigkeiten ableiten lassen.

3. Bei den Bestrahlungsversuchen reagierten die Fluorescyten auf den gesetzten Reiz scheinbar in der gleichen Weise wie die Retikulocyten. Vergleicht man aber die Fluorescytenkurve des bestrahlten Tieres mit der Fluorescytenkurve eines unbehandelten, so sieht man, daß bei den Fluorescyten auch unter physiologischen Verhältnissen recht erhebliche Schwankungen in ihrer Zahl auftreten können. Die hohen Fluorescytenwerte wären hier demnach nicht im Sinne einer Fluorescytose zu deuten.

4. Bei den Vitaminversuchen verlaufen Fluorescyten- und Retikulocytenkurve parallel, wobei die Retikulocyten-

werte bei 2 Fällen über die Fluorescytenwerte und bei einem Fall unter die der Retikulocyten zu liegen kommen.

Bei Beurteilung der Gesamtergebnisse taucht zunächst der Gedanke auf, daß die Fluorescyten in einer Beziehung zu den Retikulocyten stehen oder gar mit diesen identisch sind. Es wäre auch denkbar, daß die Fluoreszenz nur einen Teil der Retikulocyten zukommt, möglicherweise einer der Heilmeyer beschriebenen 5 Retikulocytenformen.

Für die Annahme einer Identität der Fluorescyten mit den Retikulocyten sprechen folgende Beobachtungen:

1. Das Verhalten der Retikulocyten- und Fluorescytenkurve bei der Biermer'schen Anämie,

2. der parallel Kurvenverlauf von Retikulocyten und Fluorescyten bei den Vitaminversuchen.

Zieht man aber die weiteren Untersuchungsergebnisse zur Beurteilung dieser Frage heran, so muß die Erwägung, daß es sich bei den Fluorescyten um Retikulocyten handeln könne, abgelehnt werden. Bei einer Identität von Retikulocyten und Fluorescyten dürften nie die Fluorescyten — die Retikulocytenwerte übersteigen, wie es bei den sekundären Anämien der Fall ist. Außerdem müßte die Röntgenbestrahlung, die eine Retikulocytose bewirkt, auch eine Fluorescytose zur Folge haben. Auch dürfte nie bei einer Identität von Retikulocyten und Fluorescyten ein so uneinheitliches Fluorescyten- und Retikulocytenbild auftreten, wie es bei den Carcinom-Anämien der Fall war.

Im Anschluß an die tierexperimentellen Versuche habe ich noch 2 weitere Untersuchungen angestellt, die ich hier erwähnen möchte. Es handelte sich bei diesem um Versuche mit einem Knochenmarksextrakt von Baumann (2) und in einer 2. Versuchsreihe um das Haematoporphyrinpräparat Photodyn.

In Versuchen am Menschen hat Baumann gezeigt, daß ein bestimmt hergestellter Knochenmarksextrakt eine leukocytensteigernde Eigenschaft hat. Baumann spritzte beim Menschen 60 mg dieses Wirkstoffes 6—8 Stunden nach der Injektion errreichte die Leukocytose ihren Höchstwert, der zum Teil über 300% betrug. Die Leukocytenvermehrung hielt oft 48 Stunden und noch mehr an.

Den gleichen Knochenmarksextrakt habe ich nun Menschen und Tieren verabfolgt, um den Einfluß des Extraktes auf die Fluorescyten zu sehen.

Versuche am Menschen:

Bei der 1. Kranken handelte es sich um ein Ulcus ventrikuli, bei der 2. um eine Gastritis und bei der 3. Kranken um eine Gastroenteritis. Alle 3 Patientinnen hatten ein normales weißes und rotes Blutbild.

Im folgenden sollen die Leukocyten-, Retikulocyten- und Fluorescytenwerte dieser 3 mit Knochenmarksextrakt behandelten Patientinnen wiedergegeben werden.

I. Ulcus ventrikuli.

Zeit:	Leukocyten	Retikulocyten	Fluorescyten
9^{00}	5800	7‰	4‰
9^{10}	i. m. Injektion von 4ccm Knochenmarksextrakt.		
12^{00}	6400	11‰	6‰
18^{00}	7500	14‰	4‰

II. Gastritis:

Zeit:	Leukocyten	Retikulocyten	Fluorescyten
9^{00}	7400	9‰	4‰
9^{05}	i. m. Injektion von 2 ccm Knochenmarksextrakt.		
12^{00}	8000	13‰	4‰
18^{00}	8400	16‰	2‰

III. Gastroenteritis:

Zeit:	Leukocyten	Retikulocyten	Fluorescyten
9^{00}	4900	8‰	4‰
9^{10}	i. m. Injektion von 4 ccm Knochenmarksextrakt.		
17^{00}	7400	20‰	6‰
9^{00}	4800	9‰	4‰
9^{10}	i. m. Injektion von 4 ccm Knochenmarksextrakt.		
12^{00}	4900	12‰	4‰
18^{00}	8600	23‰	6‰

Wie aus den angeführten Tabellen deutlich zu ersehen ist, erfolgte auf die Injektion des Knochenmarksextraktes ein Leukocytenanstieg, der offenbar nicht so deutlich ist, wie es Baumann beschrieb. Baumann teilte nichts von einer dabei auftretenden Retikulocytose mit, die aus meinen Versuchen anscheinend erkennbar ist. Unbeeinflußt dagegen blieben die Fluorescyten. Der Leukocyten- sowie der Retikulocytenanstieg erreichten ihren Höchstwert etwa nach 8—9 Stunden nach der Injektion.

Versuche am Tier:

5 Meerschweinchen erhielten in Form einer i. m. Injektion 1 ccm des Baumann-Extraktes. Die Reaktion war bei allen 5 Tieren gleich. Es sollen darum nur die Leukocyten- und Fluorescytenwerte von einem Versuchtstier angeführt werden. Die Retikulocytenwerte wurden bei den Tieren nicht kontrolliert.

Zeit:	Leukocyten	Fluorescyten
9^{00}	5000	52‰
9^{10}	i. m. Injektion von 1 ccm Baumann-Extrakt.	
13^{00}	5100	50‰
16^{00}	4300	70‰
18^{00}	4200	58‰
9^{00}	4000	40‰
13^{00}	3800	50‰
16^{00}	4600	70‰

Aus den angeführten Versuchen ist zu ersehen, daß beim Tier mit dem Knochenmarksextrakt von Baumann weder ein Leukocyten- noch ein Fluorescytenanstieg erzielt werden konnte.

Nach diesen Versuchen kann zusammenfassend gesagt werden, daß der Knochenmarksextrakt von Baumann beim Menschen einen Leukocyten- und Retikulocytenanstieg bewirkt. Die Fluorescyten werden von Baumann-Extrakt nicht beeinflußt. Beim Tier reagieren Fluorescyten und Leukocyten in keiner Weise auf den Extrakt.

In einer letzten Versuchsreihe wurden Tiere mit Photodyn behandelt, um den eventuellen Porphyrineinfluß auf die Fluorescyten zu sehen. Wie schon erwähnt, sollen die Fluorescyten mit den Porphyrinen in einer Beziehung stehen.

An 2 aufeinanderfolgenden Tagen wurden Meerschweinchen in Form einer i. m. Injektion 1 ccm Photodyn verabfolgt. Das Resultat zeigt die folgende Tabelle.

I. Meerschweinchen:

Untersuchungstag:	Injektion	Blutentnahme	Fluorescyten
1.		17^{00}	60‰
2.	—	17^{00}	56‰
3.	Photodyn 1 ccm i. m. 12^{00}	16^{40}	44‰

Untersuchungstag:	Injektion	Blutentnahme	Fluorescyten
3.	—	17^{45}	46‰
4.	—	17^{00}	26‰
4.	Photodyn 1 ccm i. m. 17^{10}	17^{50}	32‰
4.	—	18^{30}	20‰
5.	—	16^{00}	28‰
6.	—	17^{00}	57‰
7.	—	17^{20}	62‰
8.	—	17^{20}	58‰

Die weiteren 4 Meerschweinchen, denen die gleiche Photodynmenge gespritzt wurde, reagierten ebenso. Es zeigte sich in allen Versuchen, daß dieses Porphyrin die Fluorescytenzahl nicht beeinflußt. Ebenso trat in der Leuchtdauer und der Intensität der Leuchtstärke keinerlei Änderung auf.

Außer den 5 Meerschweinchen erhielten noch 5 Kaninchen an 2 aufeinanderfolgenden Tagen je 4 ccm Photodyn in Form einer i. v. Injektion.

Die 5 Tiere wurden 6 Tage mehrmals täglich kontrolliert. Bei keinem dieser 5 Kaninchen zeigte sich eine fluoreszierende Zelle.

Nach Abschluß der beiden letzten Versuchsreihen ist zu ersehen, daß die Fluorescyten weder durch den Knochenmarksextrakt von B a u m a n n noch durch das Porphyrinpräparat Photodyn beeinflußt werden.

Zum Schluß dieser Arbeit ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Dr. med. et. phil. A m m o n, der diese Arbeit anregte und mich bei ihrer Durchführung in liebenswürdigster Weise und ständiger Hilfsbereitschaft unterstützte, zu danken.

Literatur.

1. H. Barbier: Vitamine C und Blut unter besonderer Berücksichtigung der Retikulocyten und des weißen Blutbildes. Klin. Wschr. 1938, Nr. 27, S. 928.
2. E. Baumann: Über einen leukocytensteigernden Wirkstoff. Klin. Wschr. 1939, Nr. 1, S. 14.
3. Borst und Königsdörffer: Untersuchungen über Porphyrine mit besonderer Berücksichtigung der Porphyria cong. Hirzel, Leipzig 1929.
4. Emminger und Battistini: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an bleivergifteten Kaninchen mit und ohne Calziumzufuhr. Virch. Arch. 290 (1933) S. 492.
5. H. Fischer: Über Hämin und Porphyrine. Dtsch. Kongr. f. inn. Med. 1933.
6. Hamperl: Fluoreszenzmikroskopie menschlicher Gewebe. Virch. Arch. 292 (1934), S. 1.
7. M. Ungericht: Wechselbeziehungen der menschlichen Retikulocyten im Knochenmark und im peripheren Blut. Fol. haemat. 60. Bd., Heft 2/3.
8. Hijmanns v. d. Bergh, Grotepass und Revers: Beitrag über das Porphyrin im Blut und Galle. Klin. Wschr. 1932, S. 1534.
9. H. Kämmerer: Biologie und Klinik der Porphyrine. Dtsch. Kongr. f. inn. Med. 1933, S. 28.
10. Keller und Seggel: Über das Vorkommen fluoreszierender Erythrocyten. I. Fol. haematol. 52, (1934), S. 241.
11. Lageder: Untersuchungen über Porphyrinvermehrung in den Erythrocyten. Klin. Wschr. 1936, S. 296.

12. Langendorff: Das Verhalten der Retikulocyten der weißen Maus nach Röntgenbestrahlung. Strahlentherapie, Bd. 55 (1936), S. 307.

13. Müller-Neef: Über das Vorkommen fluoreszierender Erythrocyten. IV Untersuchungen an Fluorescyten, Fol. haematol., Bd. 56, Heft 1, S. 27.

14. Seggel: Über das Vorkommen fluoreszierender Erythrocyten. II. Fol. haematol., Bd. 52 (1934), S. 250.

15. Seyderhelm und Grebe: Vitamine und Blut 1935.

Lebenslauf.

Am 11. September 1908 wurde ich Cornelia, Maria, Ottilie Zabrzeski als Tochter des Kaufmanns Paul Zabrzeski und dessen Ehefrau Ottilie, geb. Neumann in Beuthen OS., geboren. Ich bin deutscher Reichsangehörigkeit, arischer Abstammung und katholischen Bekenntnisses.

Von Ostern 1915 bis Ostern 1916 besuchte ich die katholische Volksschule in Beuthen OS. Von Ostern 1916 bis Ostern 1929 war ich an der dortigen höheren Töchterschule und am Oberlyzeum der armen Schulschwestern. An dieser Anstalt bestand ich Ostern 1929 die Reifeprüfung.

Das Medizinische Studium begann ich im Sommersemester 1929 an der Universität in Marburg a. d. Lahn. Die klinischen Semester absolvierte ich an den Universitäten in Bonn und Breslau. Am 29. Juni 1935 bestand ich die ärztliche Prüfung vor dem Prüfungsausschuß in Breslau. Bis zur Bestallung am 1. Juli 1936 arbeitete ich als Medizinalpraktikantin auf der Gynäkologischen Abteilung des städt. Krankenhauses zu Beuthen OS., auf der Medizinischen und Chirurgischen Abteilung des Allerheiligen-Hospitals in Breslau. Von August 1936 bis August 1937 übernahm ich Vertretungen praktischer Ärzte. Seit 1. August 1937 arbeite ich als Hilfsärztin am Gesundheitsamt und zwar bis zum 31. 1. 1939 am städtischen Gesundheitsamt in Breslau und seit dem 1. 2. 1939 am staatlichen Gesundheitsamt in Wohlau.